



Detektion von Mehrbindigkeit und differentiellen Affinitäten in großen, intrinsisch ungeordneten Proteinen mithilfe von Segmentbewegungsanalyse**

Sigrid Milles und Edward A. Lemke*

Abstract: Intrinsisch ungeordnete Proteine (IUPs) können unterschiedliche Interaktionspartner binden. Mehrere Bindungsregionen in IUPs, die durch komplexe kooperative Effekte zusammenwirken, vereinfachen solche Interaktionen. Gleichzeitig erschweren sie aber die Analyse solcher IUP-Komplexe. Um diese Schwierigkeit anzugehen, kombinierten wir Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie mit zeitaufgelöster Polarisationsspektroskopie, um die Eigenschaften der Bindung des IUP Nucleoporin 153 (Nup153) mit Transportrezeptoren (TRs) des Kerntransports zu untersuchen. Die Detektion von flexibler Segmentbewegung im Rückgrat des Proteins Nup153 zeigte lokale, regionsspezifische Bindungspräferenzen von TRs. Solche Eigenschaften bleiben oft verborgen, wenn allgemeine – nicht regionsspezifische – Eigenschaften des IUP untersucht werden. Die Affinität von funktionell und strukturell unterschiedlichen TRs für bestimmte Regionen von Nup153 können sich um Größenordnungen unterscheiden – ein Befund mit Bedeutung für verschiedene Transportwege im Kerntransport.

Wie intrinsisch ungeordnete Proteine (IUPs) ihre außergewöhnliche Bindungsvielfalt mit ihrer Funktion als Interaktionsplattform in Einklang bringen, ist großteils unbekannt. Trotz mannigfaltigen Fortschritts^[1] bleibt es weiterhin anspruchsvoll, IUP-Komplexe zu untersuchen, vor allem wenn das IUP in der gebundenen Form in einem hohen Grade ungeordnet bleibt.^[2] Um dieses Problem anzugehen und die unterschiedlichen Bindungsregionen eines IUP zu analysieren, ist es üblich das Protein zu fragmentieren. Inzwischen ist aber klar, dass kooperative Effekte oder dynamische allosterische Interaktionen^[3] verloren gehen, wenn Bindungsstellen beschädigt oder entfernt werden. Einzelne Bindungsstellen in IUPs sind oft kurze lineare Motive (linear motifs^[4]) oder einzelne Seitenkettenmodifikationen, z.B. Phosphorylierungen.^[1b,5] Bekannte Beispiele sind Substrate von Kinasen, wie das IUP Sic1, das ungeordnet bleibt, wenn es an Cdc4 gebunden ist.^[1b] Nur eine einzige Bindungsstelle von Cdc4

scheint an der Bindung beteiligt zu sein, was die Interaktion monovalent macht, wenngleich die Zahl der Phosphorylierungen im IUP die Bindungsstärke beeinflussen kann.^[3c,6] Große Proteinkomplexe können noch viel kompliziertere Interaktionsabhängigkeiten aufweisen,^[3a,7] und Studien, die nur das globale Verhalten eines Komplexes testen, wie die Dissoziationskonstante (K_d), können einen unvollständigen Überblick ergeben.^[3b]

Hier zeigen wir, dass zeitaufgelöste Fluoreszenzanisotropie, zusammen mit Korrelationsspektroskopie und positionsspezifischer Proteinmarkierung, differenzielle Segmentbewegung des IUP-Rückgrats detektieren kann, wenn dieses an einen Interaktionspartner gebunden ist. Diese Technik kann dafür genutzt werden, lokale Bindungsstärken zwischen IUPs mit mehreren Bindungsstellen und Interaktionspartnern mit einer oder mehreren Bindungsstellen zu identifizieren. Der unerwartet hohe dynamische Bereich dieser Methode ermöglicht es, sequenzspezifische Bindungsaffinitäten über mehrere Größenordnungen hinweg im gleichen IUP zu detektieren. Dabei gibt es keine offensichtliche Größenbegrenzung für das IUP.

Wir nutzten diesen Ansatz, um Komplexe des großen, Phenylalanin-Glycin(FG)-reichen IUP Nucleoporin 153 (Nup153)^[8] zu untersuchen. Solche FG-Nucleoporine mit wiederkehrenden FG-Motiven (FG-Nups) sind zentraler Bestandteil der Permeabilitätsbarriere des Kernporenkomplexes. Als die größte molekulare Maschine in der Zelle reguliert dieser den Transport über die Kernmembran.^[9] Eine Schlüsseleigenschaft dieses Transportmechanismus ist die Interaktion zwischen FG-Motiven und gefalteten Transportrezeptoren (TRs), die ihre Fracht durch die Pore schleusen.^[10] Da TRs typischerweise mehr als eine FG-Bindungsstelle aufweisen und FG-Nups mehrere FG-Motive haben (Nup153 hat 24), sind ihre Interaktionen gleichzeitig durch „eines mit vielen“ wie auch „viele mit einem“ gekennzeichnet – ein Problem der Mehrbindigkeit (illustriert in Abbildung 1 b).^[9,11] Tatsächlich ist die Situation noch komplexer, weil die Sequenz der meisten FG-Nups, das große und multifunktionelle^[8] Nup153 eingeschlossen, heterogen, aber nicht zufällig ist und weil es unterschiedliche FG-Motive gibt (definiert durch benachbarte Aminosäuren; Abbildung 1 a). Da die Sequenz von FG-Nups nicht zwischen unterschiedlichen Spezies konserviert ist sowie wegen der Komplexität des Kernporenkomplexes und der noch immer unbekannten Beschaffenheit der Permeabilitätsbarriere ist das molekulare Verständnis darüber, wie FG-Nup-Sequenz mit Funktionalität und TR-Bindung korreliert, immer noch begrenzt.^[13] Deshalb kann ein vertieftes Verständnis von regionsspezifischer Funktio-

[*] Dr. S. Milles, Dr. E. A. Lemke
Structural and Computational Biology Unit, EMBL
Meyerhofstraße 1, 69117 Heidelberg (Deutschland)
E-Mail: lemke@embl.de

[**] Wir danken Dr. VanDelinder und Dr. Gibson sowie der gesamten Lemke-Gruppe für hilfreiche Kommentare und Diskussionen. S.M. dankt für finanzielle Unterstützung durch den Boehringer Ingelheim Fonds, und EAL dankt für Unterstützung durch das Emmy Noether Programm der DFG.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (experimentelle Details) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201403694> zu finden.

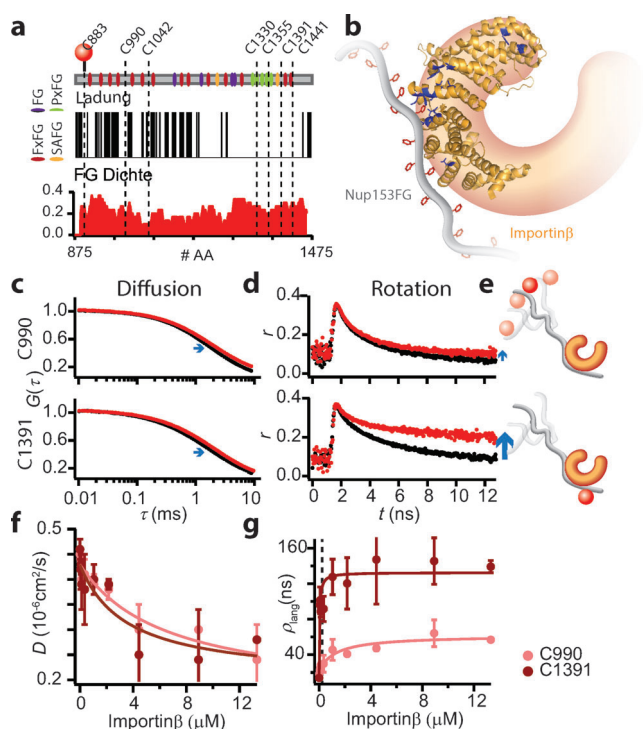


Abbildung 1. a) Schema von Nup153FG mit Markierungsstellen als gestrichelte Linien. b) Importinβ (PDB-Code: 1O6O) ist orange mit FG-Bindungsstellen in blau. Nup153FG ist grau, mit F-Resten in rot. c, d) Vergleich von FCS- ($G(\tau)$ in (c)) und Anisotropie-Rohdaten (r in (d)) von markiertem Nup153FG in der Ab- (schwarz) und Anwesenheit (rot) von Importinβ mit zugehörigem Schema von Nup153FG-Segmentbewegung (e). f, g) Importinβ-Titration, gemessen anhand von D (f) und r/ρ_{lang} (g); gestrichelte Linie bei $1 \mu\text{M}$ Importinβ.

nalität signifikant dazu beitragen, einen essenziellen Proteintransportmechanismus aufzuklären.

Proteinbindung und die Zahl gebundener Proteine können durch die hydrodynamischen Eigenschaften des Proteins/Proteinkomplexes abgeschätzt werden. Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) und zeitaufgelöste Fluoreszenzanisotropie messen beide den hydrodynamischen Radius eines markierten Proteins, indem sie translationale bzw. angulare Diffusion bestimmen.^[14] Wir markierten die FG-reiche Domäne von Nup153 (Nup153FG) positionsspezifisch mit dem Fluorophor Atto655 in der Nähe des N-Terminus (C990, d.h. 115 Aminosäuren Abstand zum N-Terminus) und des C-Terminus (C1391, d.h. 80 Aminosäuren Abstand zum C-Terminus; Nummerierung bezieht sich auf das gesamte Protein wie in Uniprot ID P49790) und maßen Diffusion und Rotation. FCS-Kurven wurden mit einem einzelnen Diffusionskoeffizienten angepasst (D), und Anisotropiekurven wurden durch die zwei Rotationszeiten ρ_{kurz} (Rotation des Fluorophors um seine Achse) und ρ_{lang} (Proteinrotation, siehe Hintergrundinformationen (SI) und Abbildung S1 (SI) für weitere Details) beschrieben. Da der kleine Fluorophor das Protein nur sehr wenig beeinträchtigt, waren FCS (D , Diffusion) und Fluoreszenzanisotropie (r , Rotation) unabhängig von der Markierungsstelle.

Anschließend fügten wir einen Überschuss des TR Importinβ (97 kDa) zu. Die Diffusion verlangsamte sich ent-

sprechend der Komplexbildung gleichermaßen für beide markierten Proteine. Die Rotationsmessungen besagten aber, dass C990 viel schneller rotierte ($\rho_{\text{lang}} \approx 30 \text{ ns}$) als C1391 ($\rho_{\text{lang}} \approx 90 \text{ ns}$; Abbildung 1d). Übereinstimmend mit einer polymerphysikalischen Betrachtung des IUP kann ein solcher Effekt mithilfe von Segmentbewegung erklärt werden.^[15] Diese besagt, dass individuelle Segmente eines Polymers (Polypeptids/Proteins) unabhängig von anderen Segmenten desselben Polymers rotieren können. Wie auch in früheren Studien mit IUPs^[15] wurde differenzielle Segmentbewegung nicht im ungebundenen Zustand detektiert. Unsere Befunde lassen aber darauf schließen, dass Segmentbewegung als Anzeige für die relative Stärke von Bindungen zu Regionen in der Nähe der Markierungsstelle innerhalb des dynamischen und großen Komplexes genutzt werden kann. Unsere Experimente deuten daher auf eine stärkere Bindung von Importinβ in der Region um C1391 als in der Region um C990 hin.

Wenn unsere Rotationsmessungen tatsächlich durch Segmentbewegung charakterisiert sind und nicht durch Rotation des gesamten Proteins, sollte ρ_{lang} nicht direkt vom Molekulargewicht (MW) des Proteins abhängen, wenn verschieden große FG-Nups analysiert werden. Wir markierten unterschiedlich große FG-Nups (Hefe- und Humanproteine) und erhielten in der Tat einen MW-unabhängigen Durchschnittswert von $\rho_{\text{lang}} = (12 \pm 1) \text{ ns}$. D , das wir aus den FCS-Messungen erhielten, skalierte aber direkt mit dem MW bei einer doppelt-logarithmischen Auftragung (Abbildung 2a).

Um den Empfindlichkeits- und Robustheitsgrad der Segmentanalyse zur Bestimmung von Bindungsaffinitäten in ungeordneten Komplexen zu testen, stellten wir Nup153FG-

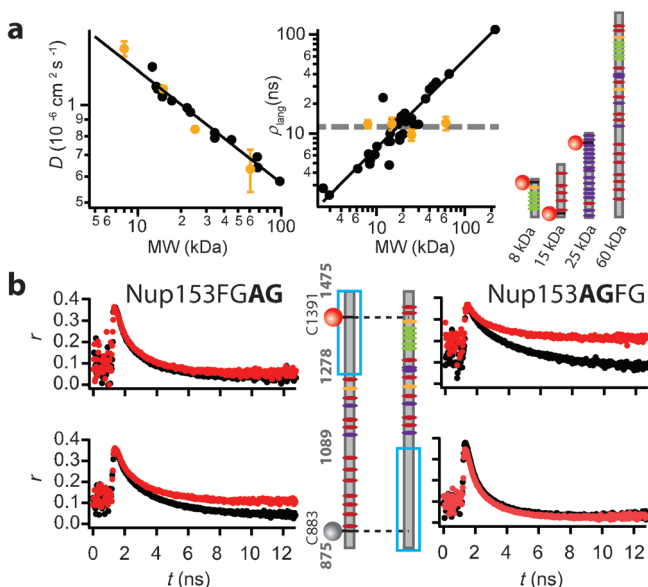


Abbildung 2. a) Diffusion und Rotation von unterschiedlich großen FG-Fragmenten (rechtes Schema; orangene Punkte mit Standardabweichung in den Graphen; die gestrichelte Linie ist der Durchschnitt). Schwarze Punkte sind Werte für aus der Literatur bekannte, globuläre Proteine mit zugehöriger Angleichung.^[16] b) Rohdaten von markiertem Nup153AGFG und Nup153FGAG in Ab- (schwarz) und Anwesenheit (rot) von Importinβ, mit zugehörigem Schema.

Chimären her, die zum Teil in ihrer TR-Bindungsfähigkeit eingeschränkt sind: Entweder in der FxFG- oder in der PxFG-reichen Region wurden alle F durch A ausgetauscht (Nup153AGFG und Nup153FGAG). FG→AG-Mutationen verhindern die Bindung von Importin β ^[17] und sollten daher die Segmentbewegung in Gegenwart von Importin β signifikant beeinflussen. Wir bauten Markierungsstellen nahe des N- und C-Terminus in diese Chimären ein (C883 und C1391) und maßen Diffusion und Rotation in An- und Abwesenheit von Importin β , wie in Abbildung 1 beschrieben. Während die Diffusion der Chimären weitestgehend gegenüber der von Nup153FG unverändert war und die Gegenwart von Importin β die Diffusion der unterschiedlichen Chimären ähnlich beeinträchtigte, wurde die Rotation durch die Gegenwart des TR differenziell beeinträchtigt. Da Importin β deutlich reduzierte Affinität zu AG-Regionen hat, war die Fluoreszenzanisotropie nur dann beeinflusst, wenn der Fluorophor in einer FG-Region angebracht war (Abbildung 2b sowie Abbildung S2 zum direkten Vergleich mit dem Wildtyp). Wie in Abbildung S3 gezeigt wird, bestätigen auch Pikosekunden-aufgelöste FCS-Messungen^[14,18] das Auftreten von Segmentbewegung.

Da bei den FCS-Messungen alle Mutanten einen ähnlichen D -Wert haben, können wir eine allgemeine, effektive Dissoziationskonstante $^D K_{d,app} \approx 1200$ nm (app: apparent) aus der Importin β -Titration abschätzen (Abbildung 1 sowie Abbildung S4, siehe SI Methoden). Wenn man aber effektive Dissoziationskonstanten $^R K_{d,app}$ aus den Rotationsmessungen bestimmt, erhält man ein ganz anderes Bild, mit 1900 nm für C990 und 40 nm (47-mal kleiner) für C1391. Auch wenn ρ_{lang} bei einer Importin β -Konzentration von 1 μ M nur um einen Faktor 3 zwischen C990 und C1391 unterschiedlich ist (30 gegenüber 90 ns), liefert uns die Titration regionspezifische $^R K_{d,app}$ -Werte, die sich innerhalb desselben Proteins um mehrere Größenordnungen unterscheiden.

Es ist auch interessant, dass D bei hohen Importin β -Konzentrationen viel kleiner wird, als wir es von einem Komplex mit 1:1-Stöchiometrie erwarten. Dies lässt darauf schließen, dass mehrere (etwa sieben) TRs Nup153FG gleichzeitig binden können (Abbildung S5). Kleine $^R K_{d,app}$ -Werte (selbst kleiner als $^D K_{d,app}$) können entweder daraus resultieren, dass ein TR stärker an die getestete Region bindet, oder dadurch, dass mehrere TRs gleichzeitig binden. Diese Möglichkeiten können nicht ohne Weiteres durch $^R K_{d,app}$ -Messungen unterschieden werden, man kann jedoch beide als „stärkere Affinität“ für die getestete Region interpretieren.

Anschließend weiteten wir unsere Studie systematisch aus und analysierten D und ρ_{lang} für sieben unterschiedliche Nup153FG-Markierungsstellen in der Gegenwart von Importin β . Wegen der Komplexität der Nup153FG-Sequenz in der zentralen Region beschränkten wir unsere Analyse auf die FxFG- und PxFG-reichen Regionen (Abbildung 1a). In diesen Experimenten zeigen wir Werte von D und ρ_{lang} für nur eine konstante Importin β -Konzentration, was relative Affinitätsunterschiede liefert, nicht aber $K_{d,app}$ -Werte für jede einzelne der getesteten Nup153FG-Regionen, wofür eine Titration nötig wäre (siehe SI Methoden). Übereinstimmend mit den Experimenten in Abbildung 2 beschreiben die sieben

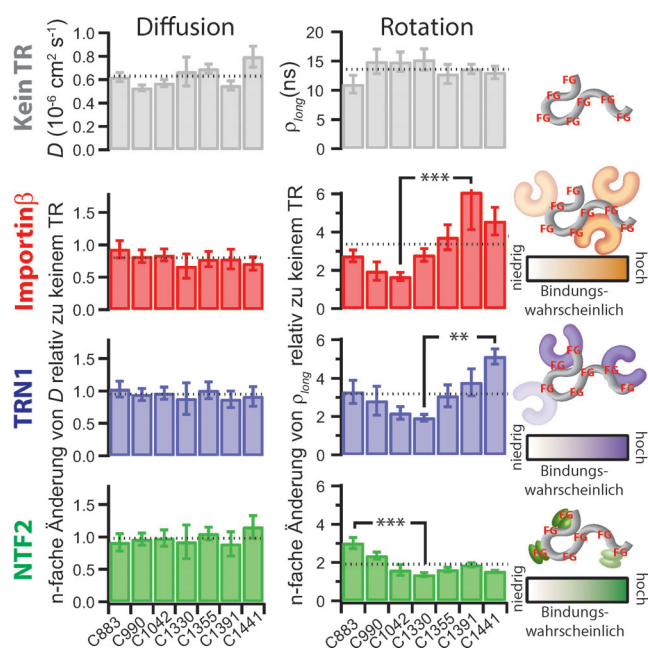


Abbildung 3. Vergleich von D und ρ_{lang} von Nup153FG allein. Das Vielfache der Änderung ist in Gegenwart der unterschiedlichen TRs dargestellt (siehe SI für TR-Konzentrationen). Gestrichelte Linien zeigen den Durchschnitt über alle Mutanten. Der Übersichtlichkeit halber sind Signifikanzlevels nur zwischen den beiden unterschiedlichsten Markierungsstellen gezeigt (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Die rechte Graphik zeigt schematisch die unterschiedlichen Bindungswahrscheinlichkeiten.

Markierungsstellen regionale Bindungspräferenzen, wobei ρ_{lang} von C1391 sechsmal größer ist als das von C1042, der schwächsten Bindungsregion von Importin β (Abbildung 3 sowie Abbildung S6 und Tabelle S1). Wie aufgrund der vorherigen Experimenten erwartet, änderte sich D nicht wesentlich zwischen den unterschiedlichen Regionen ($(0.50 \pm 0.06) \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$).

Im Kerntransport gibt es eine Reihe unterschiedlicher TRs mit verschiedenen Strukturen und Funktionen.^[10b] Motiviert durch unsere Ergebnisse mit Importin β wählten wir nun TRN1 (ähnliche superhelikale Struktur wie Importin β) und NTF2 (ein Dimer, reich an β -Faltblättern), um regionspezifische Interaktionen mit Nup153FG zu testen. Zunächst optimierten wir die TR-Konzentrationen, sodass sich der ρ_{lang} -Wert bedeutend von dem im ungebundenen Zustand gemessenen unterschied, und bestimmten nachfolgend Diffusion und Rotation (siehe SI Methoden für Details). Wie auch bei der Interaktion mit Importin β war D bei der Interaktion mit TRN1 und NTF2 weitestgehend unabhängig von der Markierungsstelle ($D_{TRN1} = (0.6 \pm 0.1) \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ und $D_{NTF2} = (0.63 \pm 0.15) \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$). Rotationsmessungen zeigten allerdings auch für TRN1 und NTF2 Bindungspräferenzen (Abbildung 3 sowie Abbildung S6 und Tabelle S1).

Affinitäten zwischen FG-Nups und TRs sind schon lange Diskussions Thema, und wegen der Tatsache, dass Nup153FG ungeordnet ist, sind K_d -Messungen nicht leicht mit klassischen biochemischen Techniken, z.B. analytischer Ultrazentrifugation oder Gel-Shift-Experimenten, zu erzielen. Zudem

können die meisten Techniken nur Affinitäten zu vollständigen FG-Nups (in vitro oder in vivo) oder biochemischen Fragmenten bestimmen (z.B. Lit. [19]). Unsere Messungen liefern reproduzierbare und robuste Informationen über differenzielle $^{\rho}K_{\text{d,app}}$ -Werte der unterschiedlichen Nup153FG-Regionen mit Importin β . Dies unterstreicht den facettenreichen Bindungscharakter selbst innerhalb eines einzigen FG-Nup und gibt Anlass zu Spekulationen über die Bedeutung unserer Ergebnisse für den Kerntransport. Unabhängig davon, welches Transportmodell wir betrachten,^[8b,20] könnten unsere differenziellen Bindungsaffinitäten der unterschiedlichen TRs zu bestimmten Regionen innerhalb von Nup153 eine molekulare Grundlage für unterschiedliche Transportwege in der Pore darstellen.^[10a] Dies wäre eine weitere Regulationsebene des komplexen Kerntransports.

Zusammenfassend haben wir für einen komplizierten und großen IUP-Komplex nachgewiesen, dass Segmentbewegungsanalyse regionsspezifische Unterschiede (vielfache Änderung in ρ_{lang}) in Protein-/Ligandbindung über mehrere Größenordnungen hinweg messen kann, ohne den Komplex zu beeinträchtigen. Während Anisotropiemessungen auf dem Fluoreszenzgebiet Standard sind, um Proteingrößen zu bestimmen, skalieren unsere Anisotropiedaten nicht mit der Proteingröße (Abbildung 2), weil IUPs eine hohe Rückgratflexibilität aufweisen.^[15a] Wir detektierten keine großen Unterschiede in der Segmentbewegung der unterschiedlichen Regionen, wenn Nup153FG ungebunden war – und dies trotz der heterogenen Sequenzzusammensetzung. Erst wenn der Nup-Importin β -Komplex gebildet wurde, konnten wir signifikant unterschiedliche Segmentbewegungen beobachten. Unsere Herangehensweise kann zwar im Prinzip auf jedes System angewendet werden, das eine starke Segmentbewegung aufweist, sie ist aber besonders bedeutend für die Analyse von IUPs innerhalb von sogenannten „fuzzy“-Komplexen.^[2] Da niedrigere Proteinkonzentrationen als bei anderen Methoden genutzt werden können, können auch aggregationsanfällige Systeme untersucht werden, zu denen auch Nup153FG gehört.^[21] Eine Limitation hin zu großen ρ_{lang} -Werten besteht darin, dass diese von ähnlicher Größe sein müssen wie die Fluoreszenzlebenszeit. Pikosekunden-FCS ermöglicht in dieser Hinsicht einen größeren dynamischen Bereich, allerdings verbunden mit dem Nachteil von komplizierterer Technik und Analyse.

Unser Ansatz erweitert daher das aktuelle Repertoire von minimalinvasiven Methoden zur Analyse und Lokalisation funktionaler Bindungsstellen ohne biochemische Fragmentierung oder Beseitigung von Bindungsstellen. Die Bandbreite an biochemischen Methoden, die entwickelt wurden, um Fluoreszenzmarker auch in komplizierte Proteine einzubauen,^[22] wird die breite Anwendbarkeit der Methode zur Analyse von unterschiedlichsten großen Komplexen (wie sie im eukaryotischen Proteom häufig vorkommen^[3c,23]) ermöglichen. Unsere Methode benötigt nur eine positionsspezifische Proteinmarkierung, was einfacher ist als intermolekularer Förster-Resonanzenergietransfer (FRET); für FRET müssten sowohl das Nup als auch Importin β markiert werden. Dieser Komplex ist so groß, dass er den dynamischen Bereich von FRET (3–10 nm)^[14] übersteigt. Da Fluoreszenz außerdem im Prinzip eine nichtinvasive Technik ist, könnte

Segmentbewegung in der Zukunft sogar dazu genutzt werden, regionsspezifische Bindungsprofile in der Zelle zu beobachten.

Eingegangen am 25. März 2014

Online veröffentlicht am 4. Juni 2014

Stichwörter: FG-Nucleoporin · Fluoreszenz · Intrinsisch ungeordnete Proteine · Ligandbindung · Mehrbindigkeit

- [1] a) K. Sugase, H. J. Dyson, P. E. Wright, *Nature* **2007**, *447*, 1021–1025; b) T. Mittag, S. Orlicky, W. Y. Choy, X. Tang, H. Lin, F. Sicheri, L. E. Kay, M. Tyers, J. D. Forman-Kay, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 17772–17777.
- [2] a) P. Tompa, M. Fuxreiter, *Trends Biochem. Sci.* **2008**, *33*, 2–8; b) M. M. Babu, R. W. Kriwacki, R. V. Pappu, *Science* **2012**, *337*, 1460–1461.
- [3] a) A. C. Ferreon, J. C. Ferreon, P. E. Wright, A. A. Deniz, *Nature* **2013**, *498*, 390–394; b) M. Fuxreiter, *Mol. Biosyst.* **2012**, *8*, 168–177; c) C. J. Oldfield, A. K. Dunker, *Annu. Rev. Biochem.*, DOI: 10.1146/annurev-biochem-072711-164947; d) J. H. Han, S. Batey, A. A. Nickson, S. A. Teichmann, J. Clarke, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 319–330.
- [4] K. Van Roey, T. J. Gibson, N. E. Davey, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2012**, *22*, 378–385.
- [5] a) C. W. Lee, J. C. Ferreon, A. C. Ferreon, M. Arai, P. E. Wright, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 19290–19295; b) J. K. Lum, H. Neuweiler, A. R. Fersht, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 1617–1622.
- [6] P. Nash, X. Tang, S. Orlicky, Q. Chen, F. B. Gertler, M. D. Mendenhall, F. Sicheri, T. Pawson, M. Tyers, *Nature* **2001**, *414*, 514–521.
- [7] M. Fuxreiter, P. Tompa, I. Simon, V. N. Uversky, J. C. Hansen, F. J. Asturias, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 728–737.
- [8] a) S. Milles, E. A. Lemke, *Biophys. J.* **2011**, *101*, 1710–1719; b) R. Y. Lim, B. Fahrenkrog, J. Koser, K. Schwarz-Herion, J. Deng, U. Aebi, *Science* **2007**, *318*, 640–643; c) A. A. Labokha, S. Gradmann, S. Frey, B. B. Hulsmann, H. Urlaub, M. Baldus, D. Gorlich, *EMBO J.* **2013**, *32*, 204–218.
- [9] S. Wälde, R. H. Kehlenbach, *Trends Cell Biol.* **2010**, *20*, 461–469.
- [10] a) J. Fiserova, S. A. Richards, S. R. Wente, M. W. Goldberg, *J. Cell Sci.* **2010**, *123*, 2773–2780; b) A. Cook, F. Bono, M. Jinek, E. Conti, *Annu. Rev. Biochem.* **2007**, *76*, 647–671.
- [11] a) R. Bayliss, T. Littlewood, M. Stewart, *Cell* **2000**, *102*, 99–108; b) M. Rangl, A. Ebner, J. Yamada, C. Rankl, R. Tampe, H. J. Gruber, M. Rexach, P. Hinterdorfer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 10356–10359; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 10546–10549.
- [12] J. R. Ball, K. S. Ullman, *Chromosoma* **2005**, *114*, 319–330.
- [13] R. L. Adams, S. R. Wente, *Cell* **2013**, *152*, 1218–1221.
- [14] E. Sisamak, A. Valeri, S. Kalinin, P. J. Rothwell, C. A. M. Seidel, *Methods Enzymol.* **2010**, *474*, 455–514.
- [15] a) N. Jain, M. Bhattacharya, S. Mukhopadhyay, *Biophys. J.* **2011**, *101*, 1720–1729; b) A. Saxena, J. B. Udgaonkar, G. Krishnamoorthy, *Protein dynamics and protein folding dynamics revealed by time-resolved fluorescence*, Springer, New York, **2005**, S. 163–179.
- [16] I. N. Serdyuk, *Methods in Molecular Biophysics: Structure, Dynamics, Function*, Cambridge University Press, Cambridge, **2007**.
- [17] S. S. Patel, M. F. Rexach, *Mol. Cell. Proteomics* **2008**, *7*, 121–131.
- [18] F. Hillger, D. Hanni, D. Nettels, S. Geister, M. Grandin, M. Textor, B. Schuler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6184–6188; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 6279–6283.

- [19] a) J. Bednenko, G. Cingolani, L. Gerace, *J. Cell Biol.* **2003**, *162*, 391–401; b) I. Ben-Efraim, L. Gerace, *J. Cell Biol.* **2001**, *152*, 411–417; c) J. Tetenbaum-Novatt, L. E. Hough, R. Mironska, A. S. McKenney, M. P. Rout, *Mol. Cell. Proteomics* **2012**, *11*, 31–46; d) L. C. Tu, G. Fu, A. Zilman, S. M. Musser, *EMBO J.* **2013**, *32*, 3220–3230.
- [20] R. Peters, *Bioessays* **2009**, *31*, 466–477.
- [21] S. Milles, K. Huy Bui, C. Koehler, M. Eltsov, M. Beck, E. A. Lemke, *EMBO Rep.* **2013**, *14*, 178–183.
- [22] a) S. Milles, E. A. Lemke, *BioEssays* **2013**, *35*, 65–74; b) S. Milles, S. Tyagi, N. Banterle, C. Koehler, V. VanDelinder, T. Plass, A. P. Neal, E. A. Lemke, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 5187–5195; c) I. Nikić, T. Plass, O. Schraidt, J. Szymanski, J. A. Briggs, C. Schultz, E. A. Lemke, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 2245–2249; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 2278–2282.
- [23] P. Tompa, M. Fuxreiter, C. J. Oldfield, I. Simon, A. K. Dunker, V. N. Uversky, *BioEssays* **2009**, *31*, 328–335.
-